重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡生长性能、肠道消化酶活性和菌群的影响

李佳骏[1] 王振华[2] 胡正茂[3] 唐慧琴[1] 谷笑笑[1] 廖成斌[3] 潘康成[1*]

（1.四川农业大学动物医学院动物微生态工程研究中心，成都 611130；2.成都农业科技职业学院，成都 611130；3.成都中牧生物药业有限公司，成都 610000）

摘 要：本试验旨在研究芽孢表面展示鸡白痢沙门氏菌 *OmpC* 重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡生长性能、肠道消化酶活性和菌群的影响。选择 7 日龄肉鸡 120 只，随机分为 3 组，每组 4 个重复，每个重复 10 只鸡。A 组（对照组）饲喂基础饲粮，B 组和 C 组分别在基础饲粮中添加 0.1%（1.0×10^6 CFU/g）枯草芽孢杆菌 168 制剂和 0.1%（1.0×10^6 CFU/g）重组枯草芽孢杆菌 SE1 制剂，试验期 35 d。结果显示：1）与 A 组相比，C 组肉鸡的终末体重和平均增重分别增加 6.14%和 6.76%（P>0.05），料重比降低 8.21%（P>0.05）。2）28、42 日龄时，B 组和 C 组肉鸡的空肠脂肪酶和回肠蛋白酶活性显著高于 A 组（P<0.05）；B 组和 C 组肉鸡的肠道消化酶活性无显著差异（P>0.05）。3）28、42 日龄时，B 组和 C 组肉鸡的回肠、盲肠大肠杆菌数量显著低于 A 组（P<0.05），盲肠乳杆菌数量显著高于 A 组（P<0.05）。16S rRNA V3 区聚合酶链式反应–变性梯度凝胶电泳（PCR-DGGE）结果显示，B 组和 C 组肉鸡的盲肠菌群丰富度、均匀度和香农–维纳指数均显著高于 A 组（P<0.05）；C 组肉鸡盲肠菌群的相似性在 28、42 日龄时分别比 A 组高 26.8%和 15.6%，C 组和 B 组之间无显著差异（P>0.05）。结果表明，重组枯草芽孢杆菌 SE1 具有与枯草芽孢杆菌 168 相同的效果，能有效促进肉鸡生长，提高肠道脂肪酶和蛋白酶活性，调节肉鸡肠道菌群，提高肠道菌群稳定性和多样性。

关键词：重组枯草芽孢杆菌；肉鸡；生长性能；消化酶活性；肠道菌群

中图分类号：S831 文献标识码： 文章编号：

枯草芽孢杆菌为国际公认的可在饲料中直接使用的微生物菌种，能够维持和调整肠道菌群平衡，增强机体免疫力，分泌多种消化酶，提高饲料消化利用率，促进动物的生长[1-2]。枯草芽孢杆菌不分泌毒素、安全性好、易于基因调控、无密码子偏爱性、生长快、易于培养，基因重组后所表达的外源蛋白可直接分泌到环境中，为优良的外源蛋白表达系统；但其同时也能分泌蛋白酶，导致其作为分泌表达系统

收稿日期：2017-10-16

基金项目：四川省高等学校科技创新团队资助项目(KM406183.1)；四川农业大学学科双支计划项目（03571146）

作者简介：李佳骏（1995—），男，重庆人，硕士研究生，从事动物微生态研究。E-mail: 18227585635@163.com

*通信作者：潘康成，教授，博士生导师，E-mail: pankangcheng71@126.com

存在着一定的局限性；而枯草芽孢杆菌的芽孢具有耐酸、盐、挤压、高温，生产中芽孢易纯化、成本低等优点，因而，使其芽孢表面用于展示外源功能蛋白已成为研究热点[3-4]。Lian 等[5]将人类生长因子（*hGH*）表面展示于枯草芽孢杆菌芽孢衣壳并饲喂家蚕，结果显示展示于芽孢衣壳表面的 hGH 蛋白可以被家蚕消化吸收至血淋巴。Zhou 等[6]将幽门螺杆菌脲酶 B 蛋白展示于枯草芽孢杆菌芽孢衣壳表面并饲喂小鼠后发现其产生粪便脲酶 B 特异性分泌型免疫球蛋白 A（SIgA）和血清免疫球蛋白 G（IgG）。刘明刚等[7-8]构建了表面展示鸡白痢沙门氏菌外膜蛋白 *OmpC* 的重组枯草芽孢杆菌 SE1 制剂，并经口给予小鼠，发现可以诱导小鼠抗鸡白痢沙门氏菌特异性抗体并对鼠伤寒沙门氏菌病具有一定的交叉保护作用。但将表面展示技术用于构建的重组枯草芽孢杆菌对动物生长性能、肠道消化酶活性和菌群的影响鲜有报道。本试验以白羽肉鸡为试验对象，将表面展示鸡白痢沙门氏菌外膜蛋白 *OmpC* 的重组枯草芽孢杆菌 SE1 饲喂肉鸡，研究其对肉鸡生长性能、肠道消化酶活性和菌群的影响，比较其与枯草芽孢杆菌 168 效果的差异，为该重组菌的应用提供试验基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

枯草芽孢杆菌 168 制剂（活芽孢数为 1.0×10^9 CFU/g）、表面展示鸡白痢沙门菌外膜蛋白 *OmpC* 的重组枯草芽孢杆菌 SE1 制剂（活芽孢数为 1.0×10^9 CFU/g）均由本研究中心提供。

1.2　试验设计与试验饲粮

选择 7 日龄科宝–500（Cobb-500）肉鸡 120 只，随机分为 3 组，每组 4 个重复，每个重复 10 只鸡。A 组（对照组）饲喂基础饲粮，B 组在基础饲粮中添加 0.1%（1.0×10^6 CFU/g）枯草芽孢杆菌 168 制剂，C 组在基础饲粮中添加 0.1%（1.0×10^6 CFU/g）重组枯草芽孢杆菌 SE1 制剂，添加量由前期相关预试验确定。基础饲粮（无抗菌药物）由成都市彭州某饲料厂提供，其组成及营养水平见表 1。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of basal diets (air-dry basis)　　%

项目 Items	1～21 日龄 1 to 21 days of age	22～42 日龄 22 to 42 days of age
原料 Ingredients		
玉米 Corn	58.00	62.20
豆粕 Soybean meal	36.00	31.00
豆油 Soybean oil	2.00	3.00
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.40	1.20

石粉 Limestone	1.30	1.30
食盐 NaCl	0.30	0.30
预混料 Premix[1)]	1.00	1.00
合计 Total	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]		
代谢能 ME/(MJ/kg)	12.30	12.55
粗蛋白质 CP	21.02	19.22
总磷 TP	0.70	0.60
钙 Ca	0.97	0.86
赖氨酸 Lys	1.17	1.06
半胱氨酸 Cys	0.38	0.35
蛋氨酸 Met	0.50	0.42

[1)]预混料为每千克饲粮提供 Premix provided the following per kg of diets:VA 12 500 IU，VB_2 6 mg，VB_3 12 mg，VB_{12} 0.025 mg，VD_3 2 500 IU，VE 18.75 IU，VK 32.65 mg，生物素 biotin 0.032 5 mg，叶酸 folic acid 1.25 mg，烟酸 nicotinic acid 50 mg，泛酸 pantothenic 12 mg，Cu (as copper sulfate) 8 mg，Fe (as ferrous sulfate) 75 mg，Zn (as zinc sulfate) 75 mg，Mn (as manganese sulfate) 100 mg，Se (as sodium selenite) 0.15 mg，I (as potassium iodide) 10.35 mg。

[2)]代谢能为计算值，其余为实测值。ME was a calculated value, and the others were measured values.

1.3 饲养管理

试验鸡采用单层笼养，各组分别隔离饲养，红外灯保温，平均室温为 26 ℃左右。自由采食、饮水，定期清洁鸡笼。每天观察鸡群的采食、饮水和健康情况，记录耗料量和发病、死亡情况，试验期 35 d。于 7 和 21 日龄时用新城疫弱毒疫苗进行点眼、滴鼻免疫。

1.4 指标测定与方法

1.4.1 生长性能

于 42 日龄时对试验鸡进行空腹称重，称重前断料 8 h，断水 2 h，计算平均增重、料重比。

1.4.2 肠道消化酶活性

于 28 和 42 日龄时，各重复取 3 只试验鸡剖杀，取空肠和回肠肠段，用生理盐水冲洗掉内容物（至无明显内容物即可，生理盐水量无特定要求），置于冰袋上小心刮取肠黏膜，放于液氮中速冻，然后转

至-70 ℃保存，用于消化酶活性的测定。采用南京建成生物工程研究所的消化酶活性试剂盒，按照操作说明测定淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶活性。

1.4.3　肠道菌群数量

无菌称取 1 g 回肠和盲肠内容物，按文献[9]采用平板活菌计数法测定肠道大肠杆菌和乳杆菌的数量。

1.4.4　聚合酶链式反应–变性梯度凝胶电泳（PCR-DGGE）技术检测盲肠菌群多样性

无菌称取 200 mg 盲肠内容物，按文献[9]采用 PCR-DGGE 技术分析肉鸡盲肠菌群多样性。

1.5　数据处理与分析

试验数据采用 SPSS 19.0 进行处理，初步计算其平均值和标准差后，采用单因素方差分析(one-way ANOVA)程序进行方差分析，差异显著者采用 Duncan 氏法进行多重比较，差异显著水平为 P<0.05，试验数据均以“平均值±标准差”表示。

2　结果与分析

2.1　重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡生长性能的影响

试验期间未出现鸡只死亡情况。由表 2 可知，与 A 组相比，C 组肉鸡的终末体重和平均增重分别增加 6.14%和 6.76%，但差异不显著（P>0.05）；C 组肉鸡的料重比与 A 组相比降低 8.21%，与 B 组相比降低 6.28%，但差异均不显著（P>0.05）。

表 2　重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡生长性能的影响

Table 2　Effects of recombinant *Bacillus subtilis* SE1 on growth performance of broilers

项目 Items	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C
初始体重 Initial weight/(g/只)	132.00±9.19	127.00±11.60	131.00±7.38
终末体重 Final weight/(g/只)	1 907.00±226.42	1 935.00±173.93	2 024.00±244.73
平均增重 Average gain/(g/只)	1 775.00±222.87	1 808.00±169.89	1 895.00±245.91
平均采食量 Average feed intake/(g/只)	3 411.43±197.32	3 434.60±218.66	3 372.13±99.16
料重比 F/G	1.95±0.28	1.91±0.19	1.79±0.15

同行数据肩标相同或无字母表示差异不显著(P>0.05)，不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

In the same row, values with the same or no letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), while with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as below.

2.2　重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡肠道消化酶活性的影响

由表 3 可知，28 日龄时，B 组和 C 组肉鸡的空肠脂肪酶和回肠蛋白酶活性显著高于 A 组（$P<0.05$）；42 日龄时，B 组和 C 组肉鸡的空肠脂肪酶、蛋白酶和回肠蛋白酶活性显著高于 A 组（$P<0.05$）。B 组肉鸡的肠道消化酶活性与 C 组相比无显著差异（$P>0.05$）。

表 3　重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡肠道消化酶活性的影响

Table 3　Effects of recombinant *Bacillus subtilis* SE1 on intestinal digestive enzyme activities of broilers

U/mg

项目 Items	日龄 Days of age	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
空肠 Jejunum				
淀粉酶 Amylase	28	0.51±0.08	0.56±0.01	0.56±0.02
	42	1.20±0.01	1.46±0.14	1.38±0.08
脂肪酶 Lipase	28	5.12±0.54^{b}	12.19±0.34^{a}	11.68±0.20^{a}
	42	19.25±0.47^{b}	21.00±1.03^{a}	24.79±4.39^{a}
蛋白酶 Protease	28	412.94±7.24	427.95±4.19	439.73±6.31
	42	411.19±10.69^{b}	532.38±42.41^{a}	510.38±35.61^{a}
回肠 Ileum				
淀粉酶 Amylase	28	0.26±0.01	0.56±0.11	0.38±0.10
	42	0.42±0.01	0.56±0.06	0.43±0.04
脂肪酶 Lipase	28	62.74±0.52	65.55±2.59	65.57±2.96
	42	63.70±1.85	63.66±1.07	63.89±3.65
蛋白酶 Protease	28	254.75±5.23^{b}	297.52±1.08^{a}	283.38±1.86^{a}
	42	244.27±2.36^{b}	262.46±4.93^{a}	269.94±6.14^{a}

2.3　重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡肠道菌群数量的影响

由表 4 可知，28 日龄时，B 组和 C 组肉鸡的回肠、盲肠大肠杆菌数量显著低于 A 组（$P<0.05$），盲肠乳杆菌数量显著高于 A 组（$P<0.05$）；42 日龄时，B 组和 C 组肉鸡的回肠、盲肠大肠杆菌数量显著低于 A 组（$P<0.05$），乳杆菌数量显著高于 A 组（$P<0.05$）。

表 4　重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡肠道菌群数量的影响

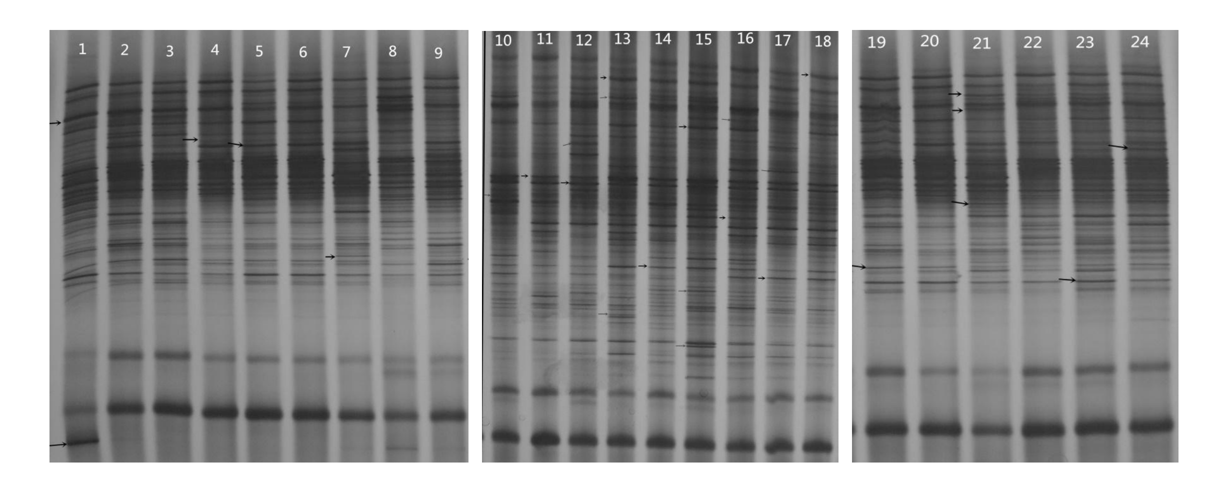
Table 4 Effects of recombinant *Bacillus subtilis* SE1 on intestinal microflora of broilers lg CFU/g

项目 Items	日龄 Days of age	A组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C
回肠 Ileum				
大肠杆菌 *Escherichia coli*	28	7.16±0.13[a]	6.68±0.39[b]	6.71±0.63[b]
	42	8.23±0.44[a]	6.27±0.46[b]	6.79±0.34[b]
乳杆菌 *Lactobacillus*	28	7.43±0.61	7.47±0.12	7.17±0.59
	42	7.92±0.41[b]	8.36±0.27[a]	8.20±0.41[a]
盲肠 Cecum				
大肠杆菌 *Escherichia coli*	28	8.54±0.40[a]	7.50±0.51[b]	7.82±0.61[b]
	42	8.45±0.78[a]	7.53±0.44[b]	7.38±0.21[b]
乳杆菌 *Lactobacillus*	28	7.51±0.51[b]	8.80±0.17[a]	8.36±0.36[a]
	42	8.83±0.25[b]	9.17±0.60[a]	9.41±0.49[a]

2.4 重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡盲肠菌群多样性的影响

由图 1 可知，B 组和 C 组肉鸡的盲肠菌群条带数多于 A 组，亮度高于 A 组，B 组和 C 组出现了较多的特异性条带。由表 5 可知，B 组和 C 组肉鸡的盲肠菌群丰富度、均匀度和香农–维纳指数均显著高于 A 组（P<0.05）。由图 2 可知，28 日龄时，A、B、C 组肉鸡盲肠菌群组内的相似性分别为 64.1%、96.2%、90.9%，A 组与 C 组间的菌群相似性为 64.1%，B 组和 C 组间的菌群相似性为 90.9%；42 日龄时，A、B、C 组组内的菌群相似性分别为 79.1%、94.7%、94.7%，A 组与 C 组间的菌群相似性为 79.1%，B 组和 C 组间的菌群相似性达 94.7%。

肉鸡盲肠菌群 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 指纹图谱中共选择了 27 个条带进行割胶回收（图 1 箭头所指），除去 6 条重复条带，其中有 12 条共性条带，9 条特性条带，测序后在 GenBank 数据库 BLAST 比对，结果见表 6。这些测序条带主要为乳杆菌属、梭菌属、粪球菌属、真杆菌属、瘤胃球菌属、厌氧醋菌属、解纤维素菌属、硫杆菌属、假单胞菌属、沙雷氏菌属的细菌。A 组特有条带为规则粪球菌；B 组和 C 组特有条带为甲基戊糖梭菌、嗜酸乳杆菌、液化沙雷氏菌、白色瘤胃球菌、糖丁基梭菌、嗜酸性硫酸盐还原菌、嗜硫杆菌、罗氏乳杆菌。



1~3、4~6、7~9：28 日龄时 A、B、C 组样品；10~12、13~15、16~18：42 日龄时 A、B、C 组样品；19、20、21：28 日龄时 A 组、B 组、C 组混合样品；22、23、24：42 日龄时 A 组、B 组、C 组混合样品。下图同。

1 to 3, 4 to 6 and 7 to 9: the samples in groups A, B and C at 28 days of age, respectively; 10 to 12, 13 to 15 and 16 to 18: the samples in groups A, B and C at 42 days of age, respectively; 19, 20 and 21: the mixed samples in groups A, B and C at 28 days of age, respectively; 22, 23 and 24: the mixed samples in groups A, B and C at 42 days of age, respectively. The same as below.

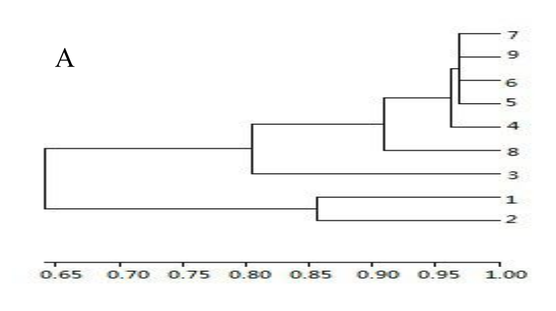
图 1　肉鸡盲肠菌群 PCR-DGGE 指纹图谱

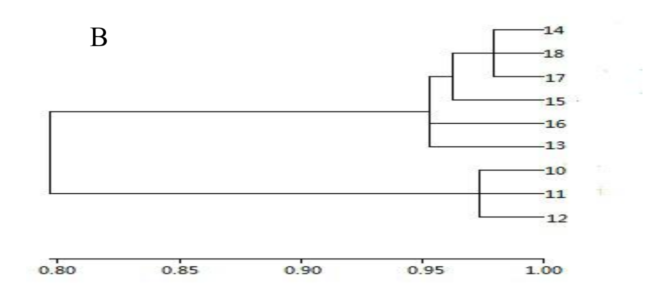
Fig.1　PCR-DGGE fingerprint of caecal microflora of broilers

表 5　肉鸡盲肠菌群多样性分析

Table 5　Diversity analysis of caecal microflora of broilers

项目 Items	日龄 Days of age	A组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C
丰富度 Richness	28	30.00±1.41^{b}	36.67±0.47^{a}	38.33±0.47^{a}
	42	41.33±0.47^{b}	46.33±0.47^{a}	45.67±1.25^{a}
均匀度 Evenness	28	0.90±0.01^{b}	0.96±0.01^{a}	0.97±0.01^{a}
	42	0.94±0.01^{b}	0.97±0.01^{a}	0.97±0.01^{a}
香农–维纳指数 Shannon-Wiener index	28	3.40±0.05^{b}	3.60±0.01^{a}	3.65±0.01^{a}
	42	3.72±0.01^{b}	3.84±0.01^{a}	3.82±0.03^{a}





A：28 日龄；B：42 日龄。

A: 28 days of age; B: 42 days of age.

图 2　肉鸡盲肠菌群 PCR-DGGE 指纹图谱聚类结果

Fig.2　Clustering result of PCR-DGGE fingerprint of caecal microflora of broilers

表 6　DGGE 指纹图谱单个条带 DNA 序列分析

Table 6　Sequences analysis of DNA recovered from single band in DGGE fingerprints

条带编号 No. of bands	序列长度 Size of sequences/bp	同源序列登陆号及细菌名称 Closest relative access number and name of bacterial	相似性 Similarity/%	备注 Note
1-1	173	NR133828.1 昆明假单胞菌 *Pseudomonas kunmingensis*	83	共有
5-1	149	NR044048.1 陪伴粪球菌 *Coprococcus comes*	97	共有
7-1	147	NR029355.1 甲基戊糖梭菌 *Clostridium methylpentosum*	91	B/C组
11-1	146	NR028961.1 普拉梭菌 *Faecalibacterium prausnitzii*	94	共有
12-1	150	NR044049.1 规则粪球菌 *Coprococcus eutactus*	98	A组
12-2	149	NR074634.1 直肠真杆菌 *Eubacterium rectale*	98	共有
13-1	151	NR102884.1 伶俐瘤胃球菌 *Ruminococcus champanellensis*	88	共有
13-2	171	NR113638.1 嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*	99	B/C组
13-3	169	NR112008.1 液化沙雷氏菌 *Serratia liquefaciens*	85	B/C组
14-1	152	NR113360.1 解纤维二糖梭菌 *Clostridium cellobioparum*	95	共有
15-1	153	NR117165.1 亨氏梭状芽孢杆菌 *Clostridium hungate*	89	共有
15-2	151	NR074399.1 白色瘤胃球菌 *Ruminococcus albus*	99	B/C组
15-3	147	NR122051.1 糖丁基梭菌 *Clostridium saccharobutylicum*	94	B/C组
16-1	153	NR074132.1 嗜酸性硫酸盐还原菌 *Desulfosporosinus acidiphilus*	91	B/C组
16-2	151	NR119067.1 解纤维梭菌 *Cellulosilyticum lentocellum*	96	共有
17-2	152	NR042930.1 厌氧醋菌 *Acetanaerobacterium elongatum*	93	共有
18-1	148	NR102884.1 解纤维瘤胃球菌 *Ruminococcus champanellensis*	87	共有
19-1	149	NR144605.1 解淀粉杆菌 *Acutalibacter muris*	95	共有
21-2	177	NR114805.1 嗜硫杆菌 *Thiobacillus plumbophilus*	97	B/C组
23-1	147	NR144697.1 梭状芽孢杆菌 *Clostridium jeddahense*	93	共有

24-1	145	NR104836.1 罗氏乳杆菌 *Lactobacillus rogosae*	96	B/C组

3 讨 论

3.1 重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡生长性能的影响

张晓云等[10]研究表明，枯草芽孢杆菌可提高肉鸡的日增重和采食量，降低料重比。本研究表明，与对照组相比，饲粮中添加重组枯草芽孢杆菌 SE1 可增加肉鸡的终末体重和平均增重，降低料重比。研究也表明，枯草芽孢杆菌能够改善动物的消化机能，提高饲料利用率，促进动物生长[11-12]。Bai 等[13]研究发现，饲喂枯草芽孢杆菌可增加肉鸡的日增重，这可能是由于枯草芽孢杆菌能够通过分泌蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等消化酶及多种维生素、生长因子和氨基酸来提高肉鸡的肠道消化功能，促进机体对营养物质的消化吸收[14]。刘瑞瑞[15]研究表明，鸡口服禽流感重组枯草芽孢杆菌能显著增强鸡的全身性免疫水平，极显著增加鸡的小肠绒毛高度；其对鸡体重的提高作用优于正常枯草芽孢杆菌。本试验研究表明，与枯草芽孢杆菌 168 相比，重组枯草芽孢杆菌 SE1 组肉鸡的终末体重和平均增重增加，料重比降低，但差异均不显著。可能是由于重组枯草芽孢杆菌 SE1 增加了机体的免疫功能，改善了小肠黏膜形态结构，尤其是影响了肠绒毛的生长和发育，进而间接影响了机体的生长性能[16]；而差异不显著可能是由于本试验饲养条件以及肉鸡品种较好，所以重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡生长性能的作用效果与枯草芽孢杆菌 168 相比无显著差异。郭晓敏[17]研究表明，在攻毒前，饲喂鸡白痢沙门菌 *OmpC-DC* 重组乳酸菌对鸡体重的影响与乳酸菌组和对照组相比无显著差异，与本试验结果相一致。

3.2 重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡肠道消化酶活性的影响

动物肠道消化酶主要包括淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶等，机体的生长代谢与消化酶活性的高低密切相关。Zokaeifar 等[18]给南美白对虾饲喂枯草芽孢杆菌 8 周后，发现试验组的肠道蛋白酶和淀粉酶活性显著高于对照组。卞国顺等[19]研究报道，饲粮中添加 10^5 CFU/g 枯草芽孢杆菌可显著提高岭南黄羽肉鸡的空肠胰蛋白酶和淀粉酶活性，但脂肪酶活性显著降低。刘清华等[20]研究发现，饲喂枯草芽孢杆菌可显著提高鳗鲡消化道中蛋白酶和淀粉酶活性。本试验中，饲喂重组枯草芽孢杆菌 SE1 可显著提高肉鸡的空肠脂肪酶和回肠蛋白酶活性，与以上研究结果相一致，这与枯草芽孢杆菌具有产生蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等消化酶的特性密切相关[21-22]；但肠道淀粉酶活性并未显著提高，与上述研究略有不同，这可能是由于枯草芽孢杆菌分泌的酶抑制了内源淀粉酶的活性，还可能是由于试验条件和试验动物种类不尽相同所致。而重组枯草芽孢杆菌 SE1 组肉鸡的肠道消化酶活性与枯草芽孢杆菌 168 组相比无显著差异，说明二者均能提高肉鸡的肠道消化酶活性，枯草芽孢杆菌芽孢衣壳表面在展示鸡白痢沙门氏菌外膜蛋白 *OmpC* 后，并不会影响其提高肠道消化酶活性的功能。

3.3 重组枯草芽孢杆菌 SE1 对肉鸡肠道菌群的影响

研究证实，枯草芽孢杆菌能够维持动物肠道微生态平衡，增加肠道菌群多样性[23-25]。裴跃明等[26]发现，饲粮中添加枯草芽孢杆菌能显著降低蛋鸡的盲肠大肠杆菌数量，增加乳酸菌和双歧杆菌数量。Park 等[27]研究发现，饲喂枯草芽孢杆菌能显著增加肉鸡盲肠的乳杆菌数量，降低沙门氏菌数量。Gao 等[28]试验发现，饲粮中添加枯草芽孢杆菌可显著降低肉鸡的盲肠大肠杆菌和沙门氏菌数量，增加乳酸菌数量。这主要是因为：1）枯草芽孢杆菌孢子进入动物肠道后，迅速萌发成繁殖体，通过生物夺氧造成肠道厌氧环境，有利于厌氧菌的生长[29]；2）产生挥发性脂肪酸和乳酸等有机酸，降低肠道 pH，从而抑制致病菌生长[30]；3）枯草芽孢杆菌能分泌多种具有拮抗作用的多肽[31]。本试验中，饲粮中添加重组枯草芽孢杆菌 SE1 可使肉鸡的回肠和盲肠大肠杆菌数量显著减少，盲肠乳杆菌数量显著增加，与以上研究结果相一致。

肠道菌群的丰富度提示肠道菌群种类多样，均匀度和香农–维纳指数提示肠道菌群的均匀分配，种类越多，分配越均匀，环境越稳定，三者在一定程度上能够提示肠道微生态环境的稳定性[32-33]。本试验结果显示，饲粮中添加重组枯草芽孢杆菌 SE1，肉鸡盲肠菌群的丰富度、均匀度和香农–维纳指数均显著高于对照组。重组枯草芽孢杆菌 SE1 组肉鸡的盲肠菌群组内的相似性显著高于对照组，其中 28 日龄时高 26.8%，42 日龄时高 15.6%；而与枯草芽孢杆菌 168 组相比，相似性达到 90%以上。PCR-DGGE 指纹图谱结果显示，重组枯草芽孢杆菌 SE1 组的特异性条带数与枯草芽孢杆菌 168 组完全相同，多于对照组。测序条带以梭菌属和乳杆菌属等有益菌为主，说明重组枯草芽孢杆菌 SE1 能够提高肉鸡的盲肠菌群多样性，维持肠道菌群的稳定性，与赵秀英等[34]、Wang 等[35]、朱沛霁[36]的报道结果相一致。但重组枯草芽孢杆菌 SE1 组和枯草芽孢杆菌 168 组中均出现了条件致病菌液化沙雷氏菌，该菌是否对肉鸡存在致病作用以及存在的原因，有待进一步研究。

本试验中，饲粮中添加重组枯草芽孢杆菌 SE1 和枯草芽孢杆菌 168 对肉鸡盲肠菌群数量及菌群多样性的影响基本一致，无显著性差异。但刘明刚等[8]研究表明，重组枯草杆菌芽孢经口服免疫可诱导机体产生特异性血清 IgG 和肠黏膜 SIgA 抗体，并可赋予小鼠抗鼠伤寒沙门氏菌感染的交叉保护作用。刘瑞瑞[15]研究发现，鸡口服禽流感重组枯草芽抱杆菌能够显著提高局部黏膜体液特异性 SIgA 和血清特异性 IgG 含量。郭晓敏[17]研究表明，饲粮中添加鸡白痢沙门菌 *OmpC-DC* 重组乳酸菌，鸡血清 IgG 和肠内容物 SIgA 含量显著增加。结合本试验结果，说明重组枯草芽孢杆菌 SE1 可以在不改变枯草芽孢杆菌 168 益生效果的基础上，诱导机体产生特异性免疫保护作用，并对异源沙门氏菌感染提供交叉保护作用，这也为枯草芽孢杆菌进一步开发利用和新型沙门氏菌疫苗的研发提供了新的思路。

4 结 论

① 饲粮中添加重组枯草芽孢杆菌 SE1 能提高肉鸡的终末体重和平均增重，降低料重比，促进肉鸡的生长性能；且与枯草芽孢杆菌 168 制剂效果相似。

② 饲粮中添加重组枯草芽孢杆菌 SE1 能显著提高肉鸡的空肠脂肪酶和回肠蛋白酶活性，但对淀粉酶活性无显著影响；且与枯草芽孢杆菌 168 制剂效果相似。

③ 饲粮中添加重组枯草芽孢杆菌 SE1 能显著降低肉鸡回肠、盲肠大肠杆菌数量，增加乳杆菌数量，显著提高盲肠菌群多样性和稳定性；且与枯草芽孢杆菌 168 制剂效果相似。

参考文献：

[1] LEE K W,KIM D K,LILLEHOJ H S,et al.Immune modulation by *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials in commercial broiler chickens[J].Animal Feed Science and Technology,2015,200:76–85.

[2] GUIDO R,GABRIELE A,GIOVANNA A,et al.Safety and efficacy of Calsporin® (*Bacillus subtilis* DSM 15544) for sows and suckling piglets[J].EFSA Journal,2017,15(4): e04761.

[3] IMAMURA D,KUWANA R,TAKAMATSU H,et al.Localization of proteins to different layers and regions of *Bacillus subtilis* spore coats[J].Journal of Bacteriology,2010,192(2):518–524.

[4] AMUGUNI H,TZIPORI S.*Bacillus subtilis*:a temperature resistant and needle free delivery system of immunogens[J].Human Vaccines & Immunotherapeutics,2012,8(7):979–986.

[5] LIAN C Q,ZHOU Y,FENG F,et al.Surface display of human growth hormone on *Bacillus subtilis*,spores for oral administration[J].Current Microbiology,2014,68(4):463–471.

[6] ZHOU Z,GONG S,LI X M,et al.Expression of Helicobacter pylori urease B on the surface of *Bacillus subtilis* spores[J].Journal of Medical Microbiology,2014,64(1):104–110.

[7] 刘明刚,刘红露,戴茜茜,等.以CotB作为融合基序在枯草芽胞杆菌芽胞表面展示雏沙门菌*OmpC*的研究[J].中国兽医科学,2015,45(11):1159–1165.

[8] 刘明刚,戴茜茜,徐毓琴,等.以CotB为分子载体表面展示鸡白痢沙门氏菌*OmpC*的重组枯草杆菌芽孢对小鼠免疫效果的研究[J].中国预防兽医学报,2015,37(12):966–969,977.

[9] 徐毓琴,王振华,潘康成,等.产γ-氨基丁酸植物乳杆菌对小鼠生长、血清抗氧化能力及盲肠菌群的影响[J].中国农业大学学报,2016,21(10):93–101.

[10] 张晓云,周同茂,段宝轩,等.枯草芽孢杆菌高耐菌株泡腾制剂对肉鸡生长性能、盲肠肠道菌群的影响[J].资源开发,2016(8):40–44.

[11] NGUYEN A T V,NGUYEN D V,TRAN M T,et al.Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH16 strain from chicken gastrointestinal tracts for use as a feed supplement to promote weight gain in broilers[J].Letters in Applied Microbiology,2015,60(6):580–588.

[12] ZAGHARI M,ZAHROOJIAN N,RIAHI M,et al.Effect of *Bacillus subtilis* spore (GalliPro®) nutrients equivalency value on broiler chicken performance[J].Animal Science Journal,2015,14(1):94–98.

[13] BAI K,HUANG Q,ZHANG J,et al.Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance,antioxidant capacity,and meat quality of broiler chickens[J].Poultry Science2016,96(1):74–82.

[14] GADDE U,OH S T,LEE Y S,et al.The effects of direct-fed microbial supplementation,as an alternative to antibiotics,on growth performance,intestinal immune status and epithelial barrier protein expression in broiler chickens[J].Probiotics and Antimicrobial Proteins,2017,9(4):397–405.

[15] 刘瑞瑞.口服禽流感重组枯草芽孢杆菌对鸡免疫和生长的影响[D].硕士学位论文.南京:南京农业大学,2015.

[16] 景翠,李福彬,赵驻军,等.日粮添加地衣芽孢杆菌对蛋鸡肠道菌群与形态结构的影响[J].中国家禽,2012,34(4):18–20.

[17] 郭晓敏.鸡白痢沙门菌*OmpC-DC*重组乳酸菌的制备与免疫效果研究[D].硕士学位论文.长春:吉林农业大学,2013.

[18] ZOKAEIFAR H,BALCÁZAR J L,SAAD C R,et al.Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance,digestive enzymes,immune gene expression and disease resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J].Fish & Shellfish Immunology,2012,33(4):683–689.

[19] 卞国顺,崔志文,姚庞,等.枯草芽孢杆菌替代抗生素对肉鸡生产性能和肠道黏膜酶活的影响[J].饲料工业,2012,33(9):34–36.

[20] 刘清华,王宝珍,郭清雄,等.枯草芽孢杆菌对黑仔期菲律宾鳗鲡生长、体成分和消化酶活性的影响[J].中国食品学报,2016,16(12):177–184.

[21] MURUGESAN G R,ROMERO L F,PERSIA M E.Effects of protease,phytase and a *Bacillus* sp. direct-fed microbial on nutrient and energy digestibility,ileal brush border digestive enzyme activity and cecal short-chain fatty acid concentration in broiler chickens[J].PLoS One,2014,9(7):e101888.

[22] HMANI H,DAOUD L,JLIDI M,et al.A *Bacillus subtilis* strain as probiotic in poultry:selection based on

in vitro functional properties and enzymatic potentialities[J].Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,2017,44(8):1157–1166.

[23] LEE S H,INGALE S L,KIM J S,et al.Effects of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* LS 1–2 fermentation biomass on growth performance,nutrient digestibility,cecal microbiota and intestinal morphology of weanling pig[J].Animal Feed Science and Technology,2014,188:102–110.

[24] HOSSAIN M M,BEGUM M,KIM I H.Effect of *Bacillus subtilis*,*Clostridium butyricum* and *Lactobacillus* acidophilus endospores on growth performance,nutrient digestibility,meat quality,relative organ weight,microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers[J].Veterinární Medicina,2015,60(2):77–86.

[25] LIU H,ZHANG J,ZHANG S H,et al.Oral administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets[J].Journal of Agricultural & Food Chemistry,2014,62(4):860–866.

[26] 裴跃明,邵强,吴桂龙,等.枯草芽孢杆菌制剂对产蛋后期蛋鸡生产性能、蛋品质、免疫及肠道菌群的影响[J].动物保健,2016,52(7):61–65,70.

[27] PARK J H,YUN H M,KIM I H.The effect of dietary *Bacillus subtilis* supplementation on the growth performance,blood profile,nutrient retention,and caecal microflora in broiler chickens[J].Journal of Applied Animal Research,2018,46 (1):868-872.

[28] GAO Z H,WU H H,SHI L,et al.Study of *Bacillus subtilis* on growth performance,nutrition metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens[J].Animal Nutrition,2017,3(2):109–113.

[29] HOLZAPFEL W H,BOTHA S J.Physiology of *Sporolactobacillus* strains isolated from different habitats and the indication of *in vitro* antagonism against *Bacillus species*[J].International Journal of Food Microbiology,1988,7(2):161–168.

[30] SUVA M A,SUREJA V P, KHENI D,et al.Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*:mechanism of action and clinical applications[J].Journal of Current Research in Scientific Medicine,2016,2(2):65–72.

[31] ABDELQADER A,AL-FATAFTAH A R,DAŞ G.Effects of dietary *Bacillus subtilis* and inulin supplementation on performance,eggshell quality,intestinal morphology and microflora composition of laying hens in the late phase of production[J].Animal Feed Science and Technology,2013,179(1/2/3/4):103–111.

[32] POSSEMIERS S,Verthé K,Uyttendaele S,et al.PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem[J].Microbiology Ecology,2014,49(3):495–507.

[33] SPELLERBERG I F,FEDOR P J.A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness,species diversity and the 'Shannon–Wiener' Index[J].Global Ecology and Biogeography,2003,12(3):177–179.

[34] 赵秀英,县怡涵,李晨博,等.灌喂植物乳杆菌和干酪乳杆菌增加仔猪肠道菌群多样性及短链脂肪酸生成[J].微生物学报,2016,56(8):1291–1300.

[35] WANG Y,SUN J,ZHONG H,et al.Effect of probiotics on the meat flavour and gut microbiota of chicken[J].Scientific Reports,2017,7:6400.

[36] 朱沛霁.枯草芽孢杆菌对雪山鸡生产性能、肠道健康和免疫机能的影响及机制[D].博士学位论文.扬州:扬州大学,2017.

Effects of Recombinant *Bacillus subtilis* SE1 on Growth Performance, Intestinal Digestive Enzyme Activities and Microflora of Broilers

LI Jiajun[1] WANG Zhenhua[2] HU Zhengmao[3] TANG Huiqin[1] GU Xiaoxiao[1] LIAO Chengbin[3] PAN Kangcheng[1*]

(1. *Animal Microecology Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu* 611130; 2. *Chengdu Agricultural College, Chengdu* 611130; 3. *Chengdu Zhongmu Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu* 610000）

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of recombinant *Bacillus subtilis* SE1 spore surface display of *Salmonella pullorum OmpC* on growth performance, intestinal digestive enzyme activities and microflora of broilers. One hundred and twenty seven-day-old broilers were randomly divided into 3 groups with 4 replicates per group and 10 broilers per replicate. Broilers in group A (control group) were fed a basal diet, and the others in groups B and C were fed the basal diets supplemented with 0.1% (1.0×10^6 CFU/g) *Bacillus subtilis* 168 and 0.1% (1.0×10^6 CFU/g) recombinant *Bacillus subtilis* SE1, respectively. The experiment lasted for 35 days. The results showed as follows: 1) compared with group A, the final weight and

*Corresponding author, professor, E-mail: pankangcheng71@126.com (责任编辑 李慧英)

average gain of broilers in group C increased by 6.14% and 6.76% (P>0.05), respectively, and ratio of feed to gain in group C decreased by 8.21% (P>0.05). 2) The activities of jejunal lipase and ileal protease of broilers in groups B and C were significantly higher than those in group A at 28 and 42 days of age (P<0.05), and there were no significant differences on intestinal digestive enzyme activities of broilers between group B and group C (P>0.05). 3) At 28 and 42 days of age, the number of *Escherichia coli* in ileum and cecum of broilers in groups B and C was significantly lower than that in group A (P<0.05), and the number of *Lactobacillus* in cecum in groups B and C was significantly higher than that in group A (P<0.05). The results of polymerase chain reaction-denatured gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) of 16S rRNA V3 zone showed that the richness, evenness and Shannon-Wiener index of caecal microflora of broilers in groups B and C were significantly higher than those in group A (P<0.05), the similarity of caecal microflora in group C increased by 26.8% and 15.6% compared with group A at 28 and 42 days of age, respectively, and there was no significant difference between group C and group B (P>0.05). It is concluded that recombinant *Bacillus subtilis* SE1 have the same effect as *Bacillus subtilis* 168, can effectively promote growth of broilers, improve the activities of intestinal lipase and protease, regulate the intestinal microflora of broilers, and improve the stability and diversity of intestinal microflora.

Key words: recombinant *Bacillus subtilis*; broilers; growth performance; digestive enzyme activities; intestinal microflora